Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
(Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger)

UNTERSUCHUNG ZU MEDIZINISCHEN ZWECKEN VERWENDETER KUNSTSTOFF-EINMALGERÄTE HINSICHTLICH IHRER STERILITÄT UND IHRES GEHALTS AN HEMMSTOFFEN, PYROGENEN UND HÄMOLYSINEN AUS KRANKENHAUSHYGIENISCHER SICHT

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gertraud Müller
aus Fürth

Würzburg, den 19.5.1981

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
(Vorstand: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger)

UNTERSUCHUNG ZU MEDIZINISCHEN ZWECKEN VERWENDETER KUNSTSTOFF-EINMALGERÄTE HINSICHTLICH IHRER STERILITÄT UND IHRES GEHALTS AN HEMMSTOFFEN, PYROGENEN UND HÄMOLYSINEN AUS KRANKENHAUSHYGIENISCHER SICHT

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gertraud Müller
aus Fürth

Würzburg, den 19.5.1981

Referent: Professor Dr. phil. W. Döll
Korreferent: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger
Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 20.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

MEINER FAMILIE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0071

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Untersuchtes Material	3
2.2.	Prüfung auf Sterilität	6
2.2.1.	Nährmedien	6
2.2.2.	Testkeime	6
2.2.3.	Untersuchungsgang	6
2.2.4.	Positivkontrollen	7
2.3.	Prüfung auf Hemmstoffe	9
2.3.1.	Testkeim und Nährmedium	9
2.3.2.	Vorbereitung der Proben	9
2.3.3.	Untersuchungsgang	10
2.4.	Prüfung auf Hämolysine	10
2.5.	Prüfung auf Endotoxine	11
2.5.1.	Material	11
2.5.2.	Untersuchungsgang	12
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
3.1.	Sterilitätsprüfung	14
3.2.	Prüfung auf Hemmstoffe und Hämolysine	16
3.3.	Prüfung auf Endotoxine	18

Seite

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 19

4.1. Sterilität und Pyrogenfreiheit 19

4.2. Gehalt an Hemmstoffen und Hämolysinen 26

5. ZUSAMMENFASSUNG 33

6. LITERATURVERZEICHNIS 35

7. ANHANG: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN NÄHRMEDIEN 45

7.1. Thioglykolatbouillon 45

7.2. VL-Agar 45

7.3. Glucosebouillon 46

7.4. Blutagar 46

7.5. Sabouraud-Flüssigmedium 46

7.6. Sabouraud-Glucose-Agar 47

1. EINLEITUNG

Der Kliniker wendet sich oft an den Krankenhaushygieniker, wenn er bei der Suche nach der Ursache plötzlich gehäuft auftretender Hospitalinfektionen Unterstützung braucht.
Da in den letzten Jahren immer mehr vom Hersteller bereits sterilisierte Kunststoff-Einmalgeräte benutzt werden, stellt sich auch die Frage, ob eventuell hier die Ursache von Fieberreaktionen zu finden ist.
So berichten SANDHAGE et al. (48) von pyrogenen Reaktionen im Zusammenhang mit Herzkatheteruntersuchungen in einer Würzburger Universitätsklinik. Die Herzkatheter waren mit einer quartären Ammoniumverbindung nach Firmenvorschrift desinfiziert worden. Im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg konnte nachgewiesen werden, daß Reste des Desinfektionsmittels in den Kathetern zurückblieben. Diese Rückstände könnten zu den pyrogenen Reaktionen geführt haben, da sie nicht mehr auftraten, als die Katheter mit Äthylenoxid sterilisiert wurden.
1976 wandte sich eine Dialysestation an das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg mit der Bitte, die Ursache in letzter Zeit bei ihren Patienten beobachteter Fieberreaktionen aufzuklären. Ausführliche Kontrollen führten zwar zu den für Dialyseeinheiten "typischen" Bakterienbefunden (BOTZENHART) (5), die aber letzlich die Patientenreaktionen nicht klären konnten. Schließlich wurde man auf ein Infusionsbesteck aufmerksam, das organische Verbindungen abgab, die sehr wohl die Ursache der Reaktionen gewesen sein könnten, denn auch hier wurden die Patienten beschwerdefrei, als ein Wechsel vorgenommen wurde, diesmal durch Einführen eines anderen Infusionssystems, in dem keine im Tierversuch pyrogenwirkenden Verbindungen nachgewiesen werden konnten.

Wenn aber Plastik-Einmalgeräte pyrogenwirkende Substanzen in Infusionslösungen abgeben können, so liegt die Vermutung nahe, daß aus ihnen auch andere (Gift-)Stoffe in Arzneimittel, Körperflüssigkeiten oder andere Gewebe der damit Behandelten diffundieren könnten. Viele Veröffentlichungen stützen diese Vermutung - ONO et al. (42): Weichmacher im Blut von Dialysepatienten; HILLMAN et al. (18): Weichmacher im Gewebe von Neugeborenen nach Transfusionen; KNUDSEN und PERSSON (26): Kadmium in Kunststoff-Einmalgeräten.
NEERGAARD et al. (41) berichten vom Auftreten einer nicht infektiösen Hepatitis bei Dialysepatienten, die, wie die Autoren vermuten, durch Diäthylphthalat hervorgerufen wurde, das als Weichmacher in einem PVC-Besteck enthalten war und in das Blut der Patienten "ausgewaschen" wurde.
Da solche Beobachtungen natürlich nicht verallgemeinert werden dürfen, im Einzelfall aber zu bedrohlichen Situationen führen können, und weil es psychologisch verständlich ist, wenn der verantwortliche Arzt geneigt ist, seine diagnostischen Bemühungen zunächst auf Gegebenheiten zu richten, die außerhalb seines persönlichen unmittelbaren Kontaktbereichs liegen, erschien es sinnvoll, zu prüfen, ob und in welchem Umfang das von der pharmazeutischen Industrie gelieferte, im klinischen Alltag verwendete Einmalmaterial

1. steril
2. frei von Hemmstoffen
3. frei von Hämolysinen
4. frei von Endotoxinen

ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchtes Material

Die untersuchten Kunststoffgeräte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Zum überwiegenden Teil handelt es sich um vom Hersteller bereits steril verpacktes Einwegmaterial; nur der Penrose-Drain (in Tabelle 1 lfd. Nr. 27) wurde erst in einer Würzburger Universitätsklinik einzeln in Plastikhüllen verschweißt und 90 Minuten lang mit Äthylenoxid gassterilisiert.
Von jeder Charge wurden je 10 einzeln verpackte Geräte untersucht.

Tabelle 1: Zusammenstellung des untersuchten Einwegmaterials

1. Geräte für die intravenöse Diagnostik und Therapie:

lfd. Nr.	(Firmen-) Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
1	PEHA-Einmalkanüle	Hartmann AG, Heidenheim	Punktionskanüle
2	Braunüle	B. Braun AG, Melsungen	Punktionskanüle
3	Mandrin für Braunüle	B. Braun AG, Melsungen	Mandrin
4	Punktionskanüle mit Griffplatte	Dasco, Mirandola	Punktionskanüle
5	Hämoset	Vygon GmbH & CO KG, Aachen	Anstichschlauch
6	Venen-Katheter	B. Braun AG, Melsungen	Venenkatheter
7	Steriven-Katheter	Sterimed, Saarbrücken	Venenkatheter
8	Hemodialysis Angiocath	Deseret Pharmaceutical CO, Sandy	Einstichkanüle
9	Fistula needle set	Avon Medicals	Nadelset für arterio-venöse Fistel
10	Fistula needle set	Vymed Ltd.	Nadelset für arterio-venöse Fistel
11	A. V. Fistula Cannulation set	Travenol Laboratories S. A., Brüssel	Nadelset für arterio-venöse Fistel
12	Ivauflex	Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt	Infusionssystem
13	Transfu°118°PAL	Dubernard GmbH, Düsseldorf	Infusions- und Transfusionssystem
14	Heidelberger Verlängerungsstück	B. Braun AG, Melsungen	Verlängerung einer Infusionsleitung
15	Haemodialysis supplies	Bellco, Mirandola	Infusionssystem
16	Haemodialysis tubing set	Bellco, Mirandola	Blutschlauch-system
17	Hämodialyse-Anschlußgerät	B. Braun AG, Melsungen	Hämodialyse-anschlußgerät
18	Venofix	B. Braun AG, Melsungen	Perfusionsbesteck

lfd. Nr.	(Firmen-) Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
19	Perfusionsbesteck	B. Braun AG, Melsungen	Perfusionsbesteck
20	Perfusionsschlauch	Dasco, Mirandola	Perfusionsschlauch

2. Nahtmaterialien:

21	Suprylon	J. Pfrimmer & Co, Erlangen	Nahtmaterial
22	Sutupak Mersilene	Ethicon GmbH, Norderstedt	Nahtmaterial
23	Seide, schwarz geflochten	Ethicon GmbH, Norderstedt	Nahtmaterial
24	Synthofil	B. Braun AG, Melsungen	Nahtmaterial

3. Einmalhandschuhe:

25	Ethiparat	Johnson-Johnson GmbH, Norderstedt	Einmalhandschuh
26	Sempermed	Semperit, Austria	Einmaloperations-handschuh

4. Blasenkatheter:

27	Female Cath Kit	Davol Inc., Providence	Einmalkatheter
28	Eru Tiemann Catheter	Willy Rüsch, Stetten-Rommelshausen	Einmalkatheter

5. Drainage:

29	Penrose-Drain	Willy Rüsch, Stetten-Rommelshausen	Drainage für Operationswunden

2.2. Prüfung auf Sterilität

Die Untersuchung wurde im wesentlichen nach den Vorschriften des Europäischen Arzneibuchs (EuAB Bd. II) (15) durchgeführt.

2.2.1. Nährmedien

Für die Erfassung von Anaerobiern wurde Thioglykolatbouillon nach BREWER (7), für den Nachweis von Aerobiern Glucosebouillon und für niedere Pilze SABOURAUD-Flüssigmedium (SABOURAUD) (47) verwendet.
Da in der Thioglykolatbouillon neben Anaerobiern auch Aerobier wachsen (BREWER) (7), wurden Subkulturen sowohl auf Blutagar-Nährböden angelegt und aerob bebrütet, als auch auf VL-Agar-Platten (BEERENS und TAHON-CASTEL) (2) ausgestrichen und anaerob, mittels der Pyrogallol-Kaliumkarbonat-Kieselgur-Methode (KOCH) (27) bebrütet. Für die Subkulturen aus der Glucosebouillon wurde Blutagar, für die aus dem SABOURAUD-Flüssigmedium SABOURAUD-Glucose-Agar (SABOURAUD) (47) verwendet und aerob bebrütet.
(Zusammensetzung der erwähnten Nährmedien siehe Anhang 7.1.-7.6.)

2.2.2. Testkeime

Für die Positivkontrollen wurden folgende Keime verwendet: Für aerobes Wachstum Staphylococcus aureus SG 511 für anaerobes Wachstum Clostridium perfringens und zum Nachweis des Wachstums niederer Pilze die Hefe Candida albicans. Die zuletzt genannten Stämme waren aus Patientenmaterial isoliert worden.

2.2.3. Untersuchungsgang

Nachdem die Unversehrtheit der Verpackung überprüft war, wurden die Einmalgeräte unter Benützung eines Laminar-Air-Flows [1] unter sterilen Kautelen entnommen, je nach Größe

---

[1] Hersteller: Gelman-Instruments; Vertrieb: Flow Laboratories GmbH, Bonn.

des Geräts ggf. mittels ausgeglühter Scheren und Pinzetten in Stücke zerschnitten und in die unter 2.2.1. beschriebenen Flüssigmedien gelegt. Die Proben wurden 14 Tage lang bei 37°C bebrütet. Erfolgte nach dieser Zeit keine Trübung der Nährmedien, also kein Keimwachstum, so wurden sie als "steril" beurteilt.
War eine Trübung zu erkennen, wurde auf den unter 2.2.1. genannten korrespondierenden Nährboden eine Subkultur angelegt und, wie dort beschrieben, bebrütet. Von den entstandenen Kolonien wurde ein Gram-Präparat angefertigt. Die endgültige Beurteilung erfolgte nach den Regeln des EuAB.

2.2.4. Positivkontrollen

Zum Nachweis der Eignung der Nährmedien wurde Thioglykolatbouillon mit etwa 100 Keimen des Anaerobiers C. perfringens, Glucosebouillon mit etwa 100 Keimen des Aerobiers S. aureus und SABOURAUD-Flüssigmedium mit etwa 100 Keimen der Hefe C. albicans beimpft, 2 Tage lang bei 37°C bebrütet, und das Keimwachstum an Hand der makroskopisch sichtbaren Trübung abgelesen.
Zum Ausschluß antimikrobieller Eigenschaften der untersuchten Einmalgeräte wurde gleichzeitig die Wirksamkeit der Nährmedien in Gegenwart der zu untersuchenden Probe wie folgt geprüft: Je Charge und Nährmedium wurden 2 Reagenzgläser mit der Probe und dem Nährmedium beschickt und, wie oben beschrieben, mit etwa 100 Keimen des jeweiligen Teststammes beimpft und 2 Tage lang bei 37°C bebrütet. Das Keimwachstum, abzulesen am Grade der Trübung, wurde mit dem in den erstgenannten Nährmedien verglichen. Konnten mit dem bloßen Auge keine Wachstumsunterschiede festgestellt werden, wurde angenommen, daß die Probe die Wirksamkeit des Nährmediums nicht herabsetzt und somit die Ergebnisse des Sterilitätstests aussagekräftig sind.

Die für die Positivkontrollen benötigten Bakterien- bzw. Pilzsuspensionen mit definierter Keimzahl pro Milliliter wurden wie folgt hergestellt:
Eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes der 3 Testkeime, die 24h bebrütet worden war, wurde von dem entsprechenden Nährboden (siehe 2.2.1.) mittels Impföse abgenommen, in 4,5 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung eingerieben, die so entstandene Suspension maschinell geschüttelt und hiervon ausgehend eine Verdünnungsreihe in Zehnerstufen hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 0,1 ml auf den entsprechenden Nährböden verteilt, diese unter Laminar-Air-Flow getrocknet und 1-2 Tage bei 37°C aerob bzw. anaerob nach KOCH (27) bebrütet und die entstandenen Kolonien gezählt.
Dieser Arbeitsgang wurde zehnmal wiederholt. Die Keimzahlen, die sich in 0,1 ml derjenigen Verdünnungsstufe befanden, die größenordnungsmäßig der vom EuAB geforderten Konzentration von 1 000 Keimen/ml am nächsten kamen, gezählt (für S. aureus war dies in 10^5 facher Verdünnung, für C. albicans und C. perfringens in 10^4 facher Verdünnung der Fall) und der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s der Koloniezahlen berechnet.
Für den Aerobier S. aureus ergab sich $\bar{x}$ = 112, s = 68, für die Hefe C. albicans $\bar{x}$ = 40, s = 20 und für den Anaerobier C. perfringens $\bar{x}$ = 80, s = 56.
Aus den Mittelwerten ließ sich das Flüssigkeitsvolumen errechnen, das 100 Keime enthielt. Dieses wurde von der oben erwähnten Verdünnungsstufe der jeweiligen Keimsuspension abgenommen und den Positivkontrollen beigefügt.

Um - wegen der großen Streubreite der Mittelwerte - während des eigentlichen Sterilitätstests eine Kontrolle über die tatsächlich zugefügte Zahl vermehrungsfähiger Einheiten zu erhalten, wurde wie folgt verfahren:

Von der für die jeweilige Positivkontrolle benutzten Keimsuspension wurde 0,1 ml abgenommen, auf den korrespondierenden Nährböden verteilt und, wie oben beschrieben, getrocknet und bebrütet. Lag die Anzahl der auf diesen Gußplatten gewachsenen Kolonien wesentlich unter oder über den errechneten Mittelwerten, so wurde die Positivkontrolle wiederholt.

2.3. Prüfung auf Hemmstoffe

2.3.1. Testkeim und Nährmedium

Als Testkeim wurde der Aerobier Bacillus subtilis (BGA), der in Form einer Sporensuspension mit einer Konzentration von 10^8 Sporen/ml vorlag [1], ausgewählt; denn LEVETZOW (34) und MEYER et al. (39) kommen im Rahmen der tierärztlichen Fleischbeschau und MILLET et al. (40) im Verlauf einer biologischen Toxizitätsprüfung von Plastikflaschen für Infusionslösungen zu dem Schluß, daß der Sporenbildner B. subtilis gegenüber Hemmstoffen empfindlicher ist als die sonst üblicherweise benutzten Stämme. Als Nährmedium kam der unter 7.4. beschriebene Nähragar zur Anwendung.

2.3.2. Vorbereitung der Proben

Pro Charge wurden 10 Proben, je nach Größe ganz oder unter sterilen Kautelen in 3-4 cm große Stücke zerschnitten, in Petrischalen gelegt. Bestand das Einmalgerät aus mehreren Kunststoffen bzw. Metallen, wurde möglichst jedes der Materialien auf wachstumshemmende Eigenschaften untersucht. Da manchmal nur 10 Proben zur Verfügung standen, wurden, wenn es sich um unzerschneidbare Teile der Plastikgeräte handelte, nur 5 Teile dem Hemmstofftest unterzogen, da die verbleibenden 5 Proben für den Hämolysetest benötigt wurden.

---

[1] Hersteller: E. Merck, Darmstadt.

2.3.3. Untersuchungsgang

0,2 ml der unter 2.3.1. beschriebenen Sporensuspension wurden 200 ml des bis auf 50°C abgekühlten Nähragars beigefügt und darin durch vorsichtiges Schütteln gleichmäßig verteilt. Diese Mischung wurde auf die in den Petrischalen liegenden Proben gegossen und nach dem Erstarren mit einer dünnen, unbeimpften Nähragarschicht abgedeckt. Nach Trocknung unter Laminar-Air-Flow wurden die Nähragarplatten 24h bei 10°C im Kühlschrank aufbewahrt, um der Diffusion der Hemmstoffe einen Vorsprung vor dem Keimwachstum zu geben und so eine größere Hemmzone zu erreichen (MEYER et al.) (39). Danach wurden die Platten 24h bei 37°C bebrütet und evtl. entstandene Hemmzonen um die Proben wie folgt beurteilt: Ab 1 mm Durchmesser wurden die Hemmhöfe als positiv bewertet, da nach LEVETZOW (34) eine Hemmzone dieser Ausdehnung auf jeden Fall eine Wachstumshemmung anzeigt. Auf eine weitere Messung der Hemmzonendurchmesser wurde verzichtet, weil das Ausmaß der Wachstumshemmung auch von anderen Faktoren als dem Toxizitätsgrad und der Konzentration der Hemmstoffe, die hier interessierten, abhängig ist, wie z.B. der Diffusionskonstanten des cytotoxischen Stoffes (MARTEN) (38).

2.4. Prüfung auf Hämolysine

Auf die, wie unter 2.3.2. beschrieben, vorbereiteten Proben wurde eine dünne Schicht Blutagar (Zusammensetzung siehe 7.4.) gegossen. Nach dem Trocknen unter Laminar-Air-Flow wurden die Blutagarplatten 24h bei 10°C im Kühlschrank aufbewahrt, um den evtl. vorhandenen Hämolysinen Zeit zur Diffusion in den Agar zu geben, anschließend 48h bei 37°C bebrütet und dann auf evtl. entstandene Hämolysezonen untersucht.

2.5. Prüfung auf Endotoxine

Wegen seiner einfacheren Technik und größeren Empfindlichkeit gegenüber Endotoxinen gramnegativer Bakterien, der ihn als Suchtest bei der Herstellung von Arzneimitteln geeignet macht (RONNEBERGER und STÄRK) (45), wurde für diese Arbeit der Limulustest dem Kaninchentest, der zweiten, gängigeren Testmethode bei der Suche nach Pyrogenen, vorgezogen, obwohl der Amöbozytentest bei der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln den Pyrogentest am Kaninchen nicht voll ersetzen kann (KRÜGER) (30). Das Prinzip des Limulustests beruht auf der Eigenschaft der einzigen im Blut des Pfeilschwanzkrebses (Limulus polyphemus) zirkulierenden zellulären Elemente, der Amöbozyten, bei Gegenwart geringster Mengen von Endotoxinen das Bluteiweiß des Krebses vom Sol- in Gelzustand überzuführen (LEVIN und BANG) (36).

2.5.1. Material

Als Testreagenz kam ein lyophilisiertes Limulus-Amöbozyten-Lysat, für die Positivkontrollen ein ebenfalls gefriergetrockneter, vom Hersteller mitgelieferter Escherichia coli-Endotoxinstandard und als Teströhrchen verschließbare, pyrogenfreie Reagenzgläser mit den für diesen Versuch vorgeschriebenen Maßen 10 x 75 mm zur Anwendung [1]. Das Amöbozytenlysat und der Endotoxinstandard wurden nach Herstellerangaben mit pyrogenfreiem Wasser rekonstituiert.
Für diesen Versuch wurden nur fabrikneue Glasgeräte verwendet, die durch dreistündige Heißluftsterilisation bei 200°C pyrogenfrei gemacht wurden.
Als Grundlage für die Eluate und Negativkontrollen diente steriles, pyrogenfreies Aqua pro injectione [2].
Für die Kontrolle des pH-Wertes wurde pH-Testpapier verwendet [3].

---

[1] Hersteller: Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach.
[2] Ampuwa; Hersteller: Dr. E. Fresenius KG, Bad Homburg.
[3] Lyphan; Hersteller: Dr. G. Kloz, Berlin.

2.5.2. Untersuchungsgang

Auf ihren Gehalt an Endotoxinen wurden diejenigen Geräteteile geprüft, die im Hemmstofftest ein positives Ergebnis gezeigt hatten und von Instrumenten stammten, die mit dem venösen System des Patienten in Verbindung stehen. Zusätzlich wurde noch das Injektionszwischenstück zum Einspritzen von Medikamenten der "Haemodialysis Supplies" (in Tabelle 1 lfd. Nr. 15) untersucht.
Je nach Größe wurden die durch Zerschneiden unter sterilen Bedingungen erhaltenen Proben in 5, 10 oder 15 ml pyrogenfreies Wasser eingelegt und 48h bei 37°C eluiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle ein Reagenzglas mit der entsprechenden Menge Aqua pro injectione mitinkubiert.
Bei jeder Charge wurde in einem Vortest (nach Kontrolle des pH-Wertes, der für diesen Test zwischen 6 und 7,5 liegen und gegebenenfalls mittels pyrogenfreier HCl bzw. NaOH eingestellt werden soll) geprüft, ob das Eluat die Gelbildung des Amöbozytenlysats hemmt, wie dies z.B. bei bestimmten Pflanzenalkaloiden der Fall sein kann (KRÜGER et al.) (30).
Hierfür wurde aus dem Eluat als Verdünnungsmittel und dem Endotoxinstandard eine Verdünnungsreihe in 8 Stufen hergestellt, so daß Konzentrationen zwischen 50 µg Endotoxin/ml Eluat und 10 pg Endotoxin/ml Eluat entstanden. Von jedem der 8 Röhrchen des Endotoxin-Eluat-Gemisches wurde 0,1 ml in die Teströhrchen pipettiert, mit je 0,1 ml des Amöbozytenlysats vorsichtig vermischt und 1h erschütterungsfrei bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Durch Drehen der vorsichtig herausgenommenen Teströhrchen um 180° wurde geprüft, ob sich ein fest am Boden sitzendes Gel gebildet hatte. War dies bei allen 8 Positivkontrollen der Fall, so konnte angenommen werden, daß das Eluat die Gelbildung nicht beeinflußt. Gleichzeitig mit den Positivkontrollen wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus 0,1 ml Aqua pro injectione und 0,1 ml Amöbozytenlysat

durchgeführt, bei der sich keine Gelbildung zeigen durfte, da sonst eine Kontamination des verwendeten Wassers oder der Geräte angenommen werden mußte.
Für die eigentliche Prüfung auf Endotoxine wurden 0,1 ml der Eluate und der mitinkubierten Negativkontrolle mit 0,1 ml des Amöbozytenlysats versetzt, gemischt und wie oben beschrieben inkubiert und beurteilt.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Im folgenden werden nur die Geräte aufgeführt, die in einem oder mehreren der Untersuchungsgänge ein positives Ergebnis aufwiesen. Alle anderen in Tabelle 1 (siehe 2.1.) zusammengestellten Einmalinstrumente zeigten einen negativen Befund. Eine Ausnahme bildet die Prüfung auf Endotoxine. Da hier nur 5 verschiedene Geräte untersucht wurden, wird das Gesamtergebnis aufgeführt.
In diesem Kapitel stellen die Zahlen in Klammern hinter der Bezeichnung des Geräts die laufende Nummer dar, unter der es in Tabelle 1 (siehe 2.1.) zu finden ist.

3.1. Sterilitätsprüfung

Mit einer Ausnahme wuchsen bei allen Proben in den Positivkontrollen die Keime ebensogut wie in den Nährbodenkontrollen, so daß Störfaktoren durch erhebliche antimikrobielle Eigenschaften der Einmalmaterialien auf die Sterilitätsprüfung ausgeschlossen werden konnten. Nur der Penrose-Drain (29) hemmte das Wachstum von S. aureus, so daß das negative Ergebnis, das dieser Kunststoffschlauch im Sterilitätstest zeigte, mit Vorbehalt betrachtet werden muß.

Tabelle 2: Zusammenstellung der (positiven) Ergebnisse der Sterilitätsprüfung.

Firmenbezeichnung des Einmalgeräts	Anzahl der positiven Proben	Isolierter Keim
Ivauflex (12) [1]	4	grampositive Kokken
Haemodialysis tubing set (16)	2	anaerobe Corynebakterien
Sempermed (26)	1	grampositive, koagulasepositive Staphylokokken

[1] 5 nachuntersuchte Geräte erwiesen sich steril.

3.2. Prüfung auf Hemmstoffe und Hämolysine

Tabelle 3: Zusammenstellung der (positiven) Ergebnisse des Hemmstoff- und Hämolysetests.

(Firmen-) Bezeichnung des Geräts	Beschreibung des Geräteteils mit der cytotoxischen bzw. hämolysierenden Aktivität	Anzahl der positiven Geräte im	
		Hemmstoff-test	Hämolyse-test 1)
Ivauflex (12)	Injektionszwischenstück zum Einspritzen von Medikamenten, teilw. in voller Ausdehnung, teilw. nur die vorderen zwei Drittel	10	-
Punktionskanüle mit Griff-platte (4)	Klebestelle zwischen Metall- und Plastikteil der Kanüle	10	-
A.V. Fistula Cannulation Set (11)	Metallteil der Kanüle	6 2)	-
Hämodialyse Anschluß-gerät (17)	dünner Schenkel des Heparinleitungs-T-Stücks	4 3)	-
Penrose-Drain (29)	gesamter Schlauch	10	10
Sempermed (26)	gesamter Handschuh	10	10

1) Die hämolysierenden Eigenschaften wurden nur gegenüber in Nähragar eingebetteten menschlichen Erythrozyten geprüft (näheres siehe Abschnitt 2.4.).

2) 5 nachuntersuchte Kanülen, die allerdings aus einer anderen Charge stammten, erwiesen sich als hemmstoff-negativ.

3) Es wurden nur 4 Heparinleitungs-T-Stücke und nicht, wie bei den anderen Geräten, 10 Proben untersucht. Zwei nachuntersuchte T-Stücke, die allerdings aus einer anderen Charge stammten, erwiesen sich als hemmstoff-negativ.

Abbildung 1: In sporenhaltigen Nähragar eingebettete Kanülen.
Deutlicher Hemmhof um die Klebestelle zwischen Metall- und Plastikteil (Stichkanüle mit Griffplatte (4)).

3.3. Prüfung auf Endotoxine

Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse des Limulus-Tests.

(Firmen-) Bezeichnung des Geräts	Beschreibung des untersuchten Geräteteils	Anzahl der endotoxinhaltigen Geräte
Ivauflex (12)	Injektionszwischenstück zum Einspritzen von Medikamenten	0
Punktionskanüle mit Griffplatte (4)	Kanüle	0
A. V. Fistula Cannulation Set (11)	Kanüle	0
Hämodialyse Anschlußgerät (17)	Heparinleitungs-T-Stück	0 [1)]
Haemodialysis supplies (15)	Injektionszwischenstück zum Einspritzen von Medikamenten	1

1) Hier wurden im Gegensatz zu den anderen untersuchten Einmalgeräten nicht 10, sondern nur 5 Proben untersucht.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In vorliegender Arbeit wurden verschiedene im klinischen Alltag gebrauchte Kunststoff-Einmalgeräte hinsichtlich ihrer Sterilität und ihres Gehalts an Pyrogenen, Hemmstoffen und Hämolysinen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.1.-3.3. zusammengestellt. Ihre Aussagekraft und klinische Relevanz soll im folgenden diskutiert werden.

4.1. Sterilität und Pyrogenfreiheit

Von 290 untersuchten Einmal-Instrumenten konnte bei 7 Proben (2,4 %) Keimwachstum nachgewiesen werden. Dieser Befund könnte sowohl auf ungenügende Sterilisation der betroffenen Geräte, als auch auf eine nachträgliche Verunreinigung bei makroskopisch nicht erkennbarer Verletzung der Verpackung oder eine Kontamination während des Untersuchungsgangs zurückzuführen sein. (Bei dem Infusionsbesteck "Ivauflex" lag die Vermutung nahe, daß es sich um eine Keimverschleppung am Ende der Untersuchung handelte, da nur die 4 zuletzt untersuchten Proben mit grampositiven Kokken kontaminiert waren und 5 nachuntersuchte Geräte einen negativen Befund aufwiesen (siehe Abschnitt 3.1.)).

Unter der Annahme mangelhafter Sterilisation der Geräte hätte man bei Anwendung von Äthylenoxid als sterilisierendes Agens am ehesten Sporenbildner als Kontaminationskeime zu erwarten (BORNEFF) (3), was mit wenigen Ausnahmen auch für die Sterilisation mit γ-Strahlen zutrifft (WIGERT et al.) (54). Es wurden jedoch nur grampositive Kokken und Corynebakterien gefunden (siehe Tabelle 2, Abschnitt 3.1.), also typische Haut- bzw. Luftkeime, wie sie z.B. auch häufig aus verunreinigten Blutkulturen gezüchtet werden (JENETT) (23). Das spricht eher für eine sekundäre Kontamination der Geräte.

Um falsch positive Ergebnisse beim Sterilitätstest auszuschließen - nach STOJTSCHEW (51) liegen bei Sterilitätsprüfungen die Kontaminationsraten während des Untersuchungsgangs zwischen 0,5 % und 2 %, also etwas niedriger als die Rate positiver Befunde (2,4 %) dieser Arbeit - sieht das EuAB (15) bei Proben, in denen sich Wachstum von Mikroorganismen nachweisen läßt, eine Wiederholung der Untersuchung vor. Erst wenn beim Wiederholungstest die gleichen Mikroorganismen wachsen, gilt der Test als positiv. Bei den für diese Arbeit untersuchten einmalverpackten Geräten war eine derartige Wiederholung des Tests nicht möglich, so daß die Frage, ob es sich bei den positiven Befunden dieser Arbeit um die Folgen ungenügender Sterilisation oder sekundärer Kontamination handelt, offen bleiben muß.

Von 45 mittels Limulustest untersuchten Geräten führte nur eine Probe zur Gelbildung (siehe Tabelle 4 in Abschnitt 3.3.), was 2,2 % entspricht. (Über die möglichen Ursachen einer Kontamination siehe obige Diskussion der Ergebnisse des Sterilitätstests).
Ein negatives Ergebnis im Limulustest ist jedoch mit Pyrogenfreiheit nicht gleichzusetzen, da er nur die von Bakterien gebildeten Endotoxine erfaßt (RONNEBERGER und STÄRK) (45), Pyrogene anderen Ursprungs (Viren, Pilze; siehe auch Tabelle 6, Abschnitt 4.1.) jedoch nicht nachweisen kann. Dank seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber Endotoxinen, die die des Kaninchentests übertrifft (RONNEBERGER und STÄRK) (45), sind seine Ergebnisse über die Verunreinigung der Geräte mit endotoxinbildenden Bakterien aber durchaus aussagekräftig.

Von klinischer Bedeutung ist jedoch nicht jede im Sterilitäts- oder Pyrogentest erfaßte Kontamination, da zwischen Außen- und Innensterilität unterschieden werden muß (BOROWSKI und WIGERT) (4). Ist z.B. bei einem Infusionsbesteck nur die äußere Oberfläche, etwa durch

einen Verpackungsdefekt, bakteriell kontaminiert, so wird diese Verkeimung zwar mit den in dieser Arbeit durchgeführten Test erfaßt, ist aber für den betroffenen Patienten belanglos, da sein venöses System via Infusionslösung nur mit der inneren Oberfläche des Geräts in Berührung kommt. Dies gilt jedoch nur mit folgenden Einschränkungen: Die Außenkontamination darf weder die Anschlußstelle für die Infusionsflasche, noch die dem Venenkatheter bzw. der Punktionskanüle benachbarten Teile betreffen, da ein aktives Eindringen von Bakterien nach Besiedlung der Punktionsstelle, wo austretendes Wundsekret einen guten Nährboden bildet u.a. als Ursache für infizierte Venenkatheter diskutiert wird (KONOLD et al.) (28).

Gelangen Mikroorganismen durch ein unsteriles Einmalgerät in den Körper eines Patienten, so muß dies nicht unbedingt zu klinischen Erscheinungen führen: Beispielsweise treten nach Zahnextraktionen häufig kurzzeitige Bakteriämien auf (vergleichbar mit Bakteriämie nach einmaliger intravenöser Injektion von Keimen aus einer kontaminierten Spritze), die zum größten Teil beim betroffenen Patienten zu keinerlei klinisch-manifesten Reaktionen führen; nach wenigen Minuten sind zudem meist sämtliche Keime aus der Blutbahn verschwunden (BRACHMANN) (6).
Allerdings besteht besonders beim vorgeschädigten Patienten die Gefahr einer Endokarditis (KHAIRAT) (24).
Neben Art und Menge der applizierten Keime und Pyrogene (siehe Tabellen 5 und 6: Pyrogenwirkende Dosen für den Menschen und das Kaninchen) hängt das Entstehen von Fieberreaktionen sowohl von der Abwehrlage des Patienten, als auch von der Applikationsform ab (stark pyrogene Injektionen kleinen Volumens führen, wenn sie subcutan bzw. intramuskulär gegeben werden, zu keinen ausgeprägten pyrogenen Reaktionen (PALMER) (43)).

Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die pyrogene Dosis eines endotoxinreichen Keims wie E. coli bei 10^6 Zellen/Person liegt. Eine Kontamination von medizinischen Geräten mit einer derartigen Keimmenge hält PALMER (43) für "extrem unwahrscheinlich". Der Autor sieht vor allem Produkte, die in großen Volumina angeboten werden (wie z.B. Infusionsflüssigkeiten) oder Arzneimittel, die Mikroorganismen gute Vermehrungsmöglichkeiten bieten, als besonders risikoreich hinsichtlich ihrer Konsequenzen für pyrogene Reaktionen des damit Behandelten an.

Dies soll jedoch nicht bedeuten, daß Einmalgeräte für medizinischen Gebrauch nicht Quelle schwerer Hospitalinfektionen werden können: So berichten DUMA et al. (13) von mehreren, selbst tödlichen Sepsisfällen, die auf kontaminierte Volumen-Kontroll-Infusionsbestecke ("volume-control-set") zurückgeführt werden konnten. Jedoch waren diese höchstwahrscheinlich nicht schon von vornherein durch mangelhafte Sterilisation bakteriell besiedelt, sondern teilweise aufgrund technischer Mängel (lose oder fehlende Belüftungsfilter etc.) erst während des Gebrauchs kontaminiert worden. Das bedeutet aber umgekehrt, daß auch einmal ein primär mangelhaft sterilisiertes Infusionsbesteck (evtl. Keimvermehrung in der Tropfkammer?), besonders bei längerem Gebrauch zur Streuquelle von Keimen und damit Ursache einer Sepsis werden kann.
Die schon eingangs zitierte Arbeit von SANDHAGE et al. (48) beweist ebenfalls, daß pyrogene Toxine durch medizinische Gerätschaften übertragen werden können. Da derzeit nur 20-40 Geräte pro Charge in der Herstellerfirma einer Sterilitätsprüfung unterzogen werden, was bedeutet, daß Kontaminationsraten von 2-3 % übersehen werden können (KOPPENSTEINER) (29), sollte man beim Auftreten pyrogener Reaktionen in Kliniken eine durchaus

mögliche mangelhafte Sterilisation der verwendeten Einmalartikel ins Auge fassen. Jedoch wäre genauso an eine sekundäre Kontamination, Verpackungsfehler (als Risiko sind z.B. auch Einmalgeräte anzusehen, die nicht einzeln, sondern in großen Mengen in einem Plastiksack verpackt sind (WERNER) (53)) und technische Mängel (DUMA et al.) (13) der gebrauchten Instrumente zu denken - nicht zu vergessen sind Fieberreaktionen auf allergischer oder toxischer Basis.

Tabelle 5: Pyrogenwirkende Dosen von Keimen und Endotoxinen für das Kaninchen.

Art des Pyrogens	Pyrogene Dosis pro kg Körpergewicht oder pro Kaninchen	Quelle
Endotoxin	0,001 µg/kg ≙ 10^3 Bakterienzellen/kg	Work E. (56)
Et. [1] von Shigella dysenteriae [2]	0,003 µg/kg	Bangham D. R. (1)
Et. [1] von Salmonella abortus equi (Pyrexal®)	0,0035 µg/kg	Eichenberger E. et al. (14)
Escherichia coli	10^4 Zellen [3]/kg	Marcus et al. (37)
Pseudomanas aeruginosa	10^4 Zellen [3]/kg	
B. subtilis	10^5 Zellen [3]/kg	
Influenzavirus A / PR8	2 x 10^8 Viren/kg	Siegert R. et al. (49)
Schimmelpilze	je nach Spezies 1-50 mg/Kaninchen	Work E. (55)
Toxin von Streptococcus pyogenes	10 µg/Kaninchen	Work E. (56)
Candida albicans	>10^6 Zellen/Kaninchen	Work E. (56)

1) Et. = Endotoxin

2) International Reference Preparation for Pyrogens

3) Es wurden abgetötete Zellen injiziert

Tabelle 6: Pyrogenwirkende Dosen von Endotoxinen für den Menschen

Art des Pyrogens	Pyrogene Dosis pro kg Körpergewicht oder pro Versuchsperson	Quelle
Et. [1] von *E. coli*	0,01 µg/kg [2]	Greisman S. E. et al. (17)
Et. [1] von *S. abortus equi* (Lipexal^{R})	0,002 µg/kg	Buskirk E. R. et al. (9)
Endotoxin	0,1 µg/Person ≙ 10^5 Zellen/Person	Work E. (56) berechnet nach Work E. (56)

1) Et. = Endotoxin

2) Es handelte sich um splenektomierte Versuchspersonen.

4.2. Gehalt an Hemmstoffen und Hämolysinen

Von den 29 untersuchten Gerätetypen hemmten 6 Geräte (-teile) (20,7 %) das Wachstum von B. subtilis, während 2 (6,9 %) zu Hämolysezonen im Blutagar führten. Vier der hemmstoffpositiven Einmalartikel dienen der intravenösen Applikation von Arzneimitteln bzw. der Hämodialyse. Eine Lasche für Wunddrainagen und Einmal-Operationshandschuhe fielen durch cytotoxische und hämolysierende Eigenschaften auf. Teils zeigten alle 10 Proben eines Gerätetyps, teils nur einige positive Ergebnisse. Vereinzelt variierten die Befunde je nach untersuchter Charge (näheres siehe Tabelle 4 in Abschnitt 3.2.).
Die Abschätzung des toxikologischen und klinischen Aussagewerts bakterieller Hemmtests bleibt problematisch, obwohl sie zur Eignungsprüfung von Kunststoffen für medizinische Zwecke schon längere Zeit Verwendung finden. (In Großbritannien gilt schon seit 1954 die Empfehlung, Gummisorten für die Herstellung von Transfusionsgeräten nur dann zu verwenden, wenn sie das Wachstum von Streptococcus pyogenens nicht beeinflussen (BRITISH STANDARD) (8)).
Schon die Auswahl des Testkeims ist von entscheidender Bedeutung für die Empfindlichkeit der Untersuchung, da die Widerstandsfähigkeit der Keimsuspension gegenüber wachstumshemmenden Faktoren aus Kunststoffen von Spezies zu Spezies variiert (RILEY et WINNER (44), MILLET et al. (40); siehe auch Tabelle 7). Der in dieser Arbeit verwendete Testkeim B. subtilis gilt als ausgesprochen sensibel (MILLET et al. (40), MEYER et al. (39), LEVETZOW (34)); jedoch scheint die Bakterienzelle allgemein hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber cytotoxischen Kunststoffzusätzen bestimmten tierischen Zellen unterlegen zu sein (MILLET et al. (40), CRUICKSHANK et al. (11); siehe auch Tabelle 7).

Die Autoren messen daher dem bakteriellen Hemmtest nur begrenzten Wert für die Aussonderung evtl. gefährdender Kunststoffe zu, da er nur einen Teil der potentiell schädlichen Stoffe erfaßt.
Wie die Experimente von LAWRENCE et al. (33) und ROSENBLUTH et al. (46) zeigen, lassen sich aus den Ergebnissen des Gewebekulturtests Schlüsse auf die in-vivo-Toxizität ziehen: Von den 17 (56) [1] Kunststoffen, die im Zellkulturtest wachstumshemmende Eigenschaften aufwiesen, zeigten sich 16 (36) [1] im Implantationsversuch am Kaninchen toxisch. Gegenteilige Befunde, also toxische Reaktionen beim Kaninchen bei gleichzeitigen negativen Befunden im Zellkulturtest, traten nicht auf.
Bei Übertragung dieser Untersuchungsergebnisse (siehe auch Tabelle 7) auf die vorliegende Fragestellung können folgende Vermutungen angestellt werden:

1. Wenn der bakterielle Hemmtest eine unempfindlichere Methode als der Zellkulturtest darstellt, wäre es denkbar, daß einige in vorliegender Arbeit als hemmstoff-negativ bezeichnete Kunststoffteile möglicherweise im Gewebekulturtest toxisch reagiert hätten.

2. Mit einiger Wahrscheinlichkeit würden die in dieser Arbeit als hemmstoff-positiv geltenden Geräte(-teile) auch bei bestimmten Gewebekulturen toxische Erscheinungen hervorrufen.

3. Es ist auch nicht ganz unwahrscheinlich, daß einige Kunststoffteile, die in dieser Arbeit das Wachstum von B. subtilis hemmten, auch in vivo (Kaninchen-Implantationstest) toxische Reaktionen hervorrufen könnten.
(Genaueres über die Experimente, die zu diesen Schlüssen führten, ist aus Tabelle 7 zu ersehen.)

---

[1] Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Ergebnisse von ROSENBLUTH et al. (46).

Tabelle 7: Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener biologischer Prüfungen von Kunststoffen, die im medizinischen Bereich Anwendung finden [1].

AUTOREN	ART DES UNTERSUCHTEN KUNSTSTOFFS	ERGEBNISSE DES BAKTERIEN-HEMM-TESTS 2)	ERGEBNISSE VON TOXIZITÄTS-PRÜFUNGEN AN ZELLKULTUREN 2)	ERGEBNISSE SONSTIGER BIOLOGISCHER PRÜFUNGEN
RILEY et WINNER (44), 1960	5 verschiedene Silikonsorten Probe A, B, C Probe D = Silastomer 156 Probe E = DP 2452	Str. pyogenes ø S. pyogenes ø E. coli ø Pneumococcus sp. D + S. viridans C + D +		
MILLET et al. (40), 1962	2 verschiedene Sorten PVC (PVC A, PVC B), Poliäthylen	S. aureus ø E. coli ø B. subtilis PVC A +	PVC A + 3) PVC B +	
CRUICKSHANK et al. (11), 1959	3 verschiedene Naturkautschuksorten (A,B,C) 4), 2 Sorten PVC (PVC 1, PVC 2), monomerhaltiges und -freies Nylon (N+, N-), Silikon (S) (Teile von Transfusionsbestecken)	Str. pyogenes A + C + PVC 1 + N+ +	A + 5) B + C + PVC 1 + PVC 2 + N+ +	Vergiftung der O_2-Atmung von Meerschweinchenhaut A,B,C PVC 1 PVC 2 N+ beeinträchtigen die Atmung

Tabelle 7 (Fortsetzung)

AUTOREN	ART DES UNTERSUCHTEN KUNSTSTOFFS	ERGEBNISSE DES BAKTERIEN-HEMM-TESTS 2)	ERGEBNISSE VON TOXIZITÄTS-PRÜFUNGEN AN ZELLKULTUREN 2)	ERGEBNISSE SONSTIGER BIOLOGISCHER PRÜFUNGEN
LAWRENCE et al. (33), 1969	50 verschiedene Teilstücke von medizinischen Kunststoffeinmalgeräten		17 Teilstücke + 6)	Kaninchen-implantationstest 16 Teilstücke 7) bewirken eine Irritation des Gewebes
ROSENBLUTH et al. (46), 1965	112 verschiedene Teilstücke von medizinischen Kunststoffgeräten		56 Teilstücke + 8)	Kaninchen-implantationstest 36 Teilstücke 9) bewirken eine Irritation des Gewebes

1) Die Bezeichnungen der in der Tabelle aufgeführten Bakterienarten entsprechen nicht in allen Fällen den derzeit gültigen Nomenklaturregeln; sie wurden unverändert aus der Originalliteratur übernommen.

2) Bei der Darstellung der Ergebnisse des Bakterien- und Gewebekultur-Hemmtests bedeutet "+" Hemmung des Zellwachstums, "ø" normales Wachstum.

3) Nierenzellen von Kälberembryonen mit Extrakten der Kunststoffe inkubiert.

4) A = Rubber 6107, B = Rubber 6814, C = Rubber PS; PVC 1 = PVC-casing, PVC 2 = PVC-tubing.

5) Hühnerembryo-Fibroblasten verschiedensten Ursprungs. Die Tabelle berücksichtigt keine graduellen Unterschiede der cytotoxischen Reaktion.

6) Säugerzellkultur (L-Zellen)

7) Die 16 Teilstücke, die im Implantationstest eine Irritation bewirkten, zeigten auch im Zellkulturtest ein positives Ergebnis; d.h. der Gewebekulturtest erwies sich bei einem Kunststoff als empfindlicher.

8) Mäusefibroblasten (L 929)

9) Die 36 Teilstücke, die im Implantationstest eine Irritation bewirkten, zeigten auch im Zellkulturtest ein positives Ergebnis.

Welche Folgen könnten Hemmstoffe und Hämolysine, die in Kunststoff-Einmalgeräten enthalten sind, für den damit in "Berührung" kommenden Patienten haben?
Um überhaupt irgendeine Wirkung zu entfalten, müßten diese Stoffe, sei es durch direkten Gewebekontakt oder via Arzneimittel, in den menschlichen Körper gelangen. NEERGAARD et al. (41) nehmen einen solchen Diffusionsvorgang für einen Weichmacher, der in bei Hämodialyse verwendeten PVC-Schläuchen enthalten war, an.
Bei den für diese Arbeit vorgenommenen in-vitro-Untersuchungen wanderten die Hemmstoffe und Hämolysine zunächst 24h bei 10°C, dann weitere 24h bei 37°C in den die Kunststoffteile umschließenden Agar - den man als wässriges Milieu betrachten kann -, was wahrscheinlich sowohl auf Diffusions- als auch Absorptionsvorgängen beruht.
Ob und in welchen Mengen in Kunststoffgeräten enthaltene Zusätze auch in vivo in das sie umgebende Milieu gelangen, ist von vielen Faktoren abhängig: der Extraktibilität vom Kunststoff, der Löslichkeit im umgebenden Milieu, Interaktionen mit Arzneimitteln und verschiedener Kunststoffzusätze untereinander, der Dauer der Benutzung (GEERTZ et al. (16)), der Flächenausdehnung der Oberfläche, die mit Geweben bzw. Arzneimitteln in Berührung steht (CRUICKSHANK et al. (11)), der Temperatur usw. Aufgrund dieser vielen Faktoren, welche die Diffusion und deren Ausmaß bestimmen, ist ohne weitere Experimente eine Aussage über die Ausbreitung der Hemmstoffe bzw. Hämolysine unter in-vivo-Bedingungen nicht möglich.
Daß Hämolysine, wenn sie in größeren Mengen in die Blutbahn gelangen, zu Symptomen wie Blutdruckabfall, Schock, Anurie etc. führen können, ist besonders von Transfusionszwischenfällen bekannt (WARNATZ (52)).
Aber auch Kunststoffartikel, die mit hämolysierenden Substanzen kontaminiert sind und mit dem intravenösen System des Patienten in Verbindung stehen, können zu ähnlichen Erscheinungen führen (LARSON et al. (31)).

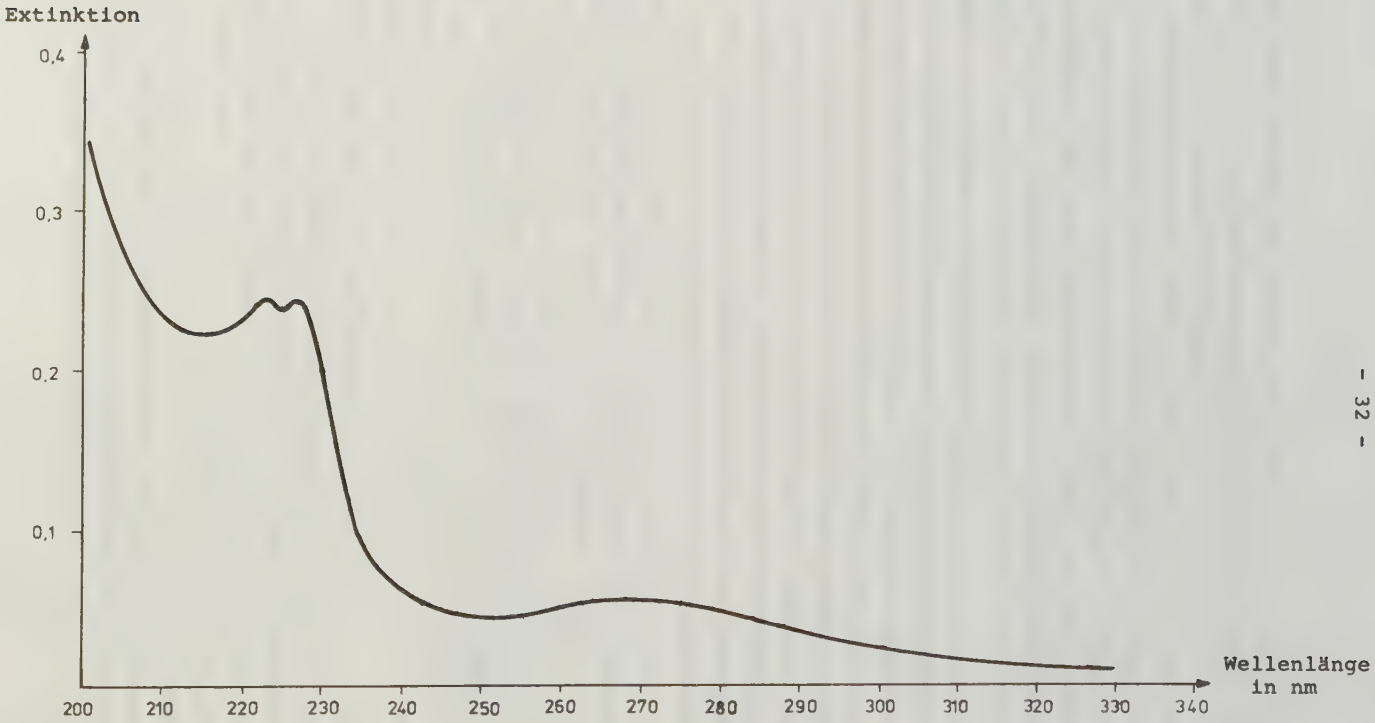
Dem tragen auch die Deutschen Normen für Industriegeräte (DIN 58 362, Blatt 1), die die Anforderungen an Infusions- und Transfusionsgeräte regeln, Rechnung.
Die Kunststoffartikel, die in dieser Arbeit untersucht wurden und hämolysierende Eigenschaften aufwiesen (OP-Handschuhe, Lasche für Wunddrainagen) stehen jedoch nicht direkt mit dem Blutsystem in Verbindung, so daß die Abschätzung der klinischen Auswirkungen der in ihnen enthaltenen hämolysierenden Substanzen problematisch bleibt.

Um genauere toxikologische Erwägungen anstellen zu können, müßte man wissen, welche chemischen Verbindungen sich hinter den cytotoxischen und hämolysierenden Substanzen verbergen. Eine chemische Analyse ginge jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. So wurde lediglich versucht, aus wässrigen Eluaten, die in etwa wie die Eluate für den Limulustest gewonnen wurden, UV-Absorptions-Spektren herzustellen. Diese zeigten jedoch, wenn überhaupt, nur uncharakteristische Absorptionsbande (siehe Abb. 2).

Am Rande sei erwähnt, daß aus Kunststoffen in den Körper auswandernde Stoffe nicht nur akut (SANDHAGE et al. (48)) und chronisch (NEERGAARD et al. (41)) toxische Folgen haben können. Es sind auch teratogene Effekte, die Akkumulation in bestimmten Geweben (JAEGER et RUBIN (21), HILLMANN et al. (18)), die Auslösung von Allergien (KIMMING (25)) und Interaktionen mit Arzneimitteln denkbar.

Heute wären viele lebensrettende medizinische Eingriffe, wie z.B. die Hämodialyse, ohne den Einsatz von Kunststoffgeräten unmöglich. Jedoch müssen die Risiken, die aus ihrer Anwendung entstehen, verantwortlich gegen ihre Vorteile abgewogen werden.
Gerade der kranke Mensch mit herabgesetzter Abwehrkraft, verminderter Leber- und Nierenfunktion etc. sollte, wenn möglich, vor den potentiellen Gefahren, die von Zusätzen in Kunststoffen ausgehen könnten, geschützt werden.

Abbildung 2: UV-Absorptions-Spektrum eines wässerigen Eluats des Penrose-Drain.



5. ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem die Anwendung von Kunststoff-Einmalgeräten in der praktischen Medizin einen immer breiteren Raum einnimmt, tritt auch häufiger die Frage auf, ob sie die Ursache von in Kliniken hin und wieder beobachteten pyrogenen Reaktionen sein könnten und ob sie außerdem frei von toxischen Nebenwirkungen sind.
Daher wurden in vorliegender Arbeit je 10 Proben von 29 verschiedenen im medizinischen Alltag gebrauchten Kunststoff-Einmalinstrumenten (Kanülen, Infusionsgeräte, Handschuhe etc.) hinsichtlich ihrer Sterilität und ihres Gehalts an Hemmstoffen und Hämolysinen untersucht.
Ein Teil der Geräte wurde auch auf Endotoxingehalt geprüft.
Von den 290 mittels Sterilitätstests untersuchten Einmalartikeln konnte bei 7 (2,4 %) Keimwachstum (grampositive Kokken, Corynebakterien) nachgewiesen werden. Die Frage, ob es sich hierbei um eine primäre oder sekundäre (Verpackungsdefekt, Verunreinigung während des Untersuchungsgangs) Kontamination handelt, mußte offen bleiben.
45 Geräte wurden mittels des Limulustests auf ihren Endotoxingehalt hin untersucht, wobei nur eine Probe (2,2 %) ein positives Ergebnis aufwies (primäre oder sekundäre Kontamination?).
Die Aussagekraft und evtl. klinische Auswirkungen der Ergebnisse des Sterilitäts- und Limulustests werden diskutiert.
Von 29 untersuchten Gerätetypen hemmten 6 Geräte-(teile) (20,7 %) nach Einbettung in Nähragar, der Sporen von B. subtilis enthielt, das Wachstum dieses Keims;
2 Instrumente (6,9 %), die allerdings nicht direkt mit dem venösen System des Patienten in Verbindung stehen, zeigten nach Einbettung in Blutagar hämolysierende Eigenschaften. Teils zeigten alle 10 Proben eines Gerätetyps, teils nur einige ein positives Ergebnis. Variationen von Charge zu Charge wurden vereinzelt beobachtet.

Die Aussagekraft und klinische Relevanz dieser Befunde wird diskutiert. Auch wenn keine definitiven Aussagen über negative klinische Auswirkungen von cytotoxischen bzw. hämolysierenden Stoffen in Kunststoffgeräten getroffen werden können, sind sie in Einzelfällen nicht mit Sicherheit auszuschließen. Daher ist nicht nur anzustreben, sondern zu fordern, daß für die medizinische Einmalanwendung Systeme ohne potentiell toxische Stoffe zur Verfügung gestellt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1)
Bangham, D. R. — Dilemma of quantitation in the test for pyrogens. A Ciba Foundation Symposium, S. 207 Chruchill Livingstone, Edinburgh, London 1971

2)
Beerens, H., M. Tahon-Castel — Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes. Presses Académiques Européennes, Bruxelles 1965

3)
Borneff, J. — Hygiene, Thieme, Stuttgart 1974

4)
Borowski, E., R. Wigert — Prüfung auf Sterilität. H. Horn: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation 2, S. 332, Volk und Gesundheit, Berlin 1974

5)
Botzenhart, K. — Infektionsprophylaxe auf Dialysestationen. Die Hygiene im Krankenhaus, Hygiene-Forum, Athen 1976

6)
Brachmann, F. — Über Bakteriämie nach Zahnextraktionen. Münch. Med. Wschr. 100, 1211, 1958

7)
Brewer, J. H. — Clear liquid mediums for the "aerobic" cultivation of anaerobes. JAMA 115, 598, 1940

8)
Anonymus — British Standard, 2463, Appendix B, S. 12, 1954, zit. nach: Riley, I.H., H.I. Winner: A note on bacteriological tests of silicone rubbers for medical and pharmaceutical uses. J. Pharm. Pharmacol. 13, 111, 1961

9)
Buskirk, E. R., R. H. Thompson, M. Rubenstein, S. M. Wolff — Heat exchange in men and women following intravenous injection of endotoxin. J. Appl. Physiol. 19, 907, 1964

10)
Cranston, W. I., M. D. Rawlins, R. H. Luff, G. W. Duff — Relevance of experimental observations to pyrexia in clinical situations. A Ciba Foundation Symposium, S. 155 Churchill Livingstone, Edinburgh, London 1971

11)
Cruickshank, C.N.D., C. Hooper, H.B.M. Lewis, J.D.B. MacDougall — The toxity of rubbers and plastics used in transfusion-giving-sets. J. Clin. Pathol. 13, 42, 1960

12)
Duke, H. N., J. R. Vane — An adverse effect of polyvinyl chloride tubing used in extracorporeal circulation. Lancet 1968/2, 21

13)
Duma, R. J., J. F. Warner, H. P. Dalton
Septicemia from intravenous Infusions.
New Eng. J. Med. 284, 257, 1971

14)
Eichenberger, E., M. Schmidhauser-Kopp, H. Hurni, M. Fricsay, O. Westphal
Biologische Wirkungen eines hochgereinigten Pyrogens aus Salmonella abortus equi.
Schweiz. Med. Wschr. 85, 1190, 1955

15)
Anonymus
Europäisches Arzneibuch, Bd. II,
Deutscher Apotheker-Verlag,
Govi-Verlag,
Stuttgart, Frankfurt 1975

16)
Geertz, W. K. Dyer, D. Johnson, B. Miller, B. Taylor, W. Sharp
Polyvinyl chloride biomedical products: Toxicity testing and identification of additives.
Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs 20, 42, 1974

17)
Greisman, S. E., E. J. Young, F. A. Carozza Jr.
Immunosuppression and endotoxin tolerance.
Clin. Res. 14, 332, 1966

18)
Hillman, L. S., S. L. Goodwin, W. R. Sherman
Identification and measurement of plasticizer in neonatal tissues after umbilical catheters and blood products.
N. Engl. J. Med. 292, 381, 1975

19)
Jacobson, M. S., S. V. Kevy, R. J. Grand
Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman Primate: a consequence of chronic transfusion therapy. J. Lab. Clin. Med. 89, 1066, 1977

20)
Jaeger, R. J., R. J. Rubin
Contamination of blood stored in plastic bags. Lancet 1970/2, 151

21)
Jaeger, R. J., R. J. Rubin
Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. N. Engl. J. Med. 287, 1114, 1972

22)
Jaeger, R. J., R. J. Rubin
Plasticizers from plastic devices: Extraction, metabolism and accumulation by biological systems. Science 170, 460, 1970

23)
Jenett, R.
Die bakteriologische Blutkultur unter besonderer Berücksichtigung neuerer Methoden. Inaugural Dissertation Würzburg 1973

24)
Khairat, O.
An effective antibiotic cover for the prevention of endocarditis following dental and other post-operative bacteraemias. J. Clin. Path. 19, 561, 1966

25)
Kimming, J., P. Schmidt
Krankheiten infolge perkutaner Allergen-Invasion.
K. Hansen, M. Werner:
Lehrbuch der klinischen Allergie,
S. 232,
Thieme,
Stuttgart 1967

26)
Knudsen, F. U., P. Persson
Exposure to Cadmium from medical plastic utensils: An examination by random sampling.
Dan. Med. Bul. 24, 45, 1977

27)
Koch, F. E.
Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen.
Zbl. Bakt. Abt. I, Orig. 132, 358, 1934

28)
Konold, P., U. Ullmann, C.-P. Schrader, G. Kieninger
Klinische und bakteriologische Beobachtungen bei intravenös eingeführten Kathetern.
Dtsch. med. Wschr. 99, 1974, 1009

29)
Koppensteiner, G.
Stellungnahmen
Hyg. + Med. 4, 152, 1979

30)
Krüger, D., G. Zimmermann, G. Hebold
Ein Beitrag zur in-vitro-Pyrogenprüfung mittels des Limulus-Tests.
Arzneim.-Forsch. 25, 160, 1975

31)
Larson, D. F., B. Mayall, R. M. Anderson
Hemolysis due to chemical Contamination of clinical perfusion apparatus.
Ann. Thorac. Surg. 23, 374, 1977

32)
Laufman, H., L. Riley, B. Badner, L. Zelner
Use of disposible products in surgical practice.
Arch. Surg. 111, 20, 1976

33)
Lawrence, W. H., J. E. Turner, J. Autian
Reevaluation of plastic tubings currently used in medical and paramedical applications.
J. Biomed. Mater. Res. 3, 291, 1969

34)
Levetzow, R.
Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU).
Bundesgesundheitsblatt 14, 211, 1971

35)
Levin, J., F. B. Bang
A description of cellular coagulation in the Limulus.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 115, 337, 1964

36)
Levin, J., F. B. Bang
The role of Gram negative endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood.
Biol. Bull. 125, 383, 1963

37)
Marcus, S., C. Anselmo, J. J. Perkins
Studies on bacterial pyrogenicity. I. Quantitative Basis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 359, 1958

38)
Marten, G.
Die mikrobiologische Antibioticabestimmung in Futtermitteln. Landwirtsch. Forschg. 67, 277, 1964

39)
Meyer, B., W. Thiel, W. Weis
Bedeutung und Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtsch. 49, 203, 1969

40)
Millet, M., Dony, Gerard, L'Hoest
Contribution à l'analyse biologique des liquides pour perfusion contenus dans des matières plastiques. Journal de Pharmacie de Belgique Nr. 5-6, 157, 1962

41)
Neergaard, J., B. Nielsen, V. Faurby, D. H. Christensen, O. F. Nielsen
Plasticizers in P.V.C. and the occurence of Hepatitis in a Haemodialysis Unit. Scand. J. Urol. Nephrol. 5, 141, 1971

42)
Ono, K., R. Tatsukawa, T. Wakimoto
Migration of Plasticizer from hemodialasis blood tubing. JAMA 234, 948, 1975

43)
Palmer, C. H. R. — Pharmaceutical aspects of pyrogens in hospital and industry. A Ciba Foundation Symposium, S. 193, Churchill Livingstone, Edinburgh, London 1971

44)
Riley, I.H., H. I. Winner — A note on bacteriological toxicity tests of silicone rubbers for medical and pharmaceutical uses. J. Pharm. Pharmacol. 13, 111, 1961

45)
Ronneberger, H., J. Stärk — Der Limulustest im Vergleich mit dem Pyrogentest am Kaninchen. Arzneim.-Forsch. 24, 933, 1974

46)
Rosenbluth, S. A., G. R. Weddington, W. L. Guess, J. Autian — Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. J. Pharm. Sci. 54, 156, 1965

47)
Sabouraud, R. — Les Teignes, Masson, Paris 1910

48)
Sandhage, K., W. Döll, E. Langer, J. Ströder — Klinische und bakteriologische Untersuchungen zur Sterilisation von Herzkathetern. Ärztl. Forsch. 25, 362, 1971

49)
Siegert, R., P. Braune — The pyrogens of myxoviruses. I. Induction of hyperthermia and its tolerance. Virology 24, 209, 1964

50)
Stähelin, H., M. Taeschler — Beitrag zur Differenzierung der Fieberwirkung von Lipopolysaccharid-Pyrogen und D-Lysergsäurediäthylamid (LSD). Helv. Physiol. Acta 17, 23, 1959

51)
Stojtschew, N. — Die Sekundärkontamination und ihr Einfluß bei der Beurteilung der Sterilitätsprüfungen. Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 495, 1968

52)
Warnatz, H. — Immunsystem
W. Siegenthaler: Klinische Pathophysiologie, S. 482, Thieme, Stuttgart 1976

53)
Werner, H.-P. — An falscher Stelle "gespart". Hyg. + Med. 4, 3, 1979

54)
Wigert, R., R. Machmerth, P. Černý — Grundlagen der Sterilisation mit ionisierenden Strahlen.
W. Weuffen: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation 3, S. 123, Volk und Gesundheit, Berlin 1974

55)
Work, E. — General Discussion, S. 215
A Ciba Foundation Symposium Churchill Livingstone, Edinburgh, London 1971

56)
Work, E. Production, chemistry and properties of bacterial pyrogens and endotoxins. S. 23
A Ciba Foundation Symposium
Churchill Livingstone,
Edinburgh, London 1971

7. ANHANG: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN NÄHRMEDIEN

7.1. Thioglykolatbouillon

Hierzu wurde ein Fertigpräparat (Hersteller: Oxoid) folgender Zusammensetzung benutzt:

Pepton aus Casein	15 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	5,5 g
L-Cystin	0,5 g
Natriumchlorid	2,5 g
Natriumthioglykolat	0,5 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	7,1 $\pm$ 0,1

Diese Mischung wurde bis zum vollständigen Auflösen im Dampftopf gekocht und dann bei 120°C 15 min lang autoklaviert.

7.2. VL-Agar

VL-Grundsubstrat	1 000 ml
Glucose	2 g
Agar- Agar	20 g

Der verflüssigte und filtrierte Nährboden wurde 20 min bei 115°C autoklaviert.

VL-Grundsubstrat:

Pepton (tryptisch verdaut)	10 g
Natriumchlorid	5 g
Fleischextrakt	2 g
Hefeextrakt	5 g
Cystein-HCl	0,3 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	7,4 - 7,5

7.3. Glucosebouillon

Fleischextrakt	3 g
Pepton aus Fleisch	10 g
Natriumchlorid	5 g
Glucose	20 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	7,3 ± 0,1

Die Mischung wurde nach vollständiger Lösung der Einzelbestandteile bei 110°C 20 min autoklaviert.

7.4. Blutagar

Einem Liter Nähragar wurden bei 50°C 70 ml menschliches Vollblut (Konservenblut) beigemischt.

Nähragar

Pepton aus Fleisch	10 g
Fleischextrakt	10 g
Natriumchlorid	5 g
Agar-Agar	18 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	7,3 ± 0,1

Die Mischung wurde 20 min bei 120°C autoklaviert.

7.5. SABOURAUD-Flüssigmedium

Glucose	50 g
Pepton aus Fleisch	25 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	5,6 ± 0,1

Die Mischung wurde nach vollständigem Lösen der Bestandteile 20 min bei 110°C autoklaviert.

7.6. SABOURAUD-Glucose-Agar

Glucose	50 g
Pepton aus Fleisch	25 g
Agar	20 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	5,6 ± 0,1

Nach vollständigem Lösen wurde der Nährboden bei 110°C 20 min autoklaviert und nach Abkühlen auf 70°C folgender Zusatz steril beigefügt:

Chloramphenicol	1 g	
Penicillin	20 000 IE	
Streptomycin-Sulfat	0,128 g	(entspricht 0,1 g Base)

Herrn Professor Dr. Döll danke ich herzlich, sowohl für die Überlassung des Themas, als auch für die immer hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Seeliger möchte ich für die Übernahme des Korreferats meinen Dank sagen.

Außerdem gilt mein Dank allen, die mir im Institut für Hygiene und Mikrobiologie freundlich Hilfe leisteten.

Lebenslauf

Name:	Gertraud Renate Müller, geb. Hofer
Geb. am:	16.2.1955 in Fürth/Bay., als zweite von drei Töchtern
Eltern:	Dr. med. Erwin Hofer, Internist und Herta Hofer, geb. Paulus, Medizinisch-Technische Assistentin
Eheschließung:	Am 15.12.1978 mit dem Studienreferendar Alois Müller
Schulen:	Volksschule in Fürth/Bay. und Kempten/Allg. 1965 bis 1974 Besuch des Sozialwissenschaftlichen Zweigs des Hildegardis-Gymnasiums in Kempten Abitur im Sommer 1974
Studium:	Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg vom Wintersemester 1974 bis zum Sommersemester 1981 Seit April 1977 Stipendiatin des Cusanuswerks
Praktisches Jahr:	Vom 21.4.80 bis 22.3.81 an der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg (Innere Medizin, Chirurgie) und an der Universitäts-Hautklinik in Würzburg
Prüfungen:	Ärztliche Vorprüfung im Aug. 1976 Ärztliche Prüfung im Apr./Mai 1981

Gertraud Müller

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80